

- al meningitis[J]. Clin Chim Acta, 2014, 435(1): 59-61.
- [12] Köser CU, Fraser LJ, Ioannou A, et al. Rapid single-colony whole-genome sequencing of bacterial pathogens[J]. J Antimicrob Chemother, 2014, 69(1): 1275-1281.
- [13] Bertelli C, Greub G. Rapid bacterial genome sequencing: methods and applications in clinical microbiology[J]. Clin Microb Infect, 2013, 19(1): 803-813.
- [14] Hasman H, Saputra D, Ponten TS, et al. Rapid whole-genome sequencing for detection and characterization of microorganisms directly from clinical samples[J]. J Clin Microb, 2014, 52 (1): 139-146.
- [15] Lu J, Yu R, Yan Y, et al. Use of Pyromark Q96 ID pyrosequencing system in identifying bacterial pathogen directly with urine specimens for diagnosis of urinary tract infections[J]. J Microbiol Methods, 2011, 86(1): 78-81.
- [16] 陈霖祥, 蔡颖, 周广彪, 等. 16S rRNA 基因快速测序法鉴定 3 种常见病原微生物[J]. 现代预防医学, 2014, 41 (17): 3180-3183.
- [17] 陈茶, 屈平华, 顾全, 等. 基于细菌 16S rRNA 基因的广谱 PCR 扩增与测序分析在临床少见菌鉴定中的应用[C]//中华医学会. 中华医学会第七次全国中青年检验医学学术会议会议论文集, 南京, 2012. 北京: 中华医学会, 2012: 151-152.
- [18] Almeida C, Azevedo NF, Bento JC, et al. Rapid detection of urinary tract infections caused by *Proteus* spp. using PNA-FISH[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2013, 32 (1): 781-786.
- [19] Machado A, Castro J, Cereija T, et al. Diagnosis of bacterial vaginosis by a new multiplex peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization method[J]. Peer J, 2015, 3 (1): e780.
- [20] Neonakis K, Spandidos DA, Petinaki E. Use of loop-mediated isothermal amplification of DNA for the rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2011, 30 (8): 937-942.
- [21] Panda A, Singh TP, Satpathy G, et al. Comparison of polymerase chain reaction and standard microbiological techniques in presumed bacterial corneal ulcers[J]. Int Ophthalmol, 2015, 35(1): 159-165.
- [22] 张焱, 郭瑞, 居军. SYBR Green 实时荧光定量 PCR 快速检测口腔幽门螺杆菌[J]. 微生物学免疫学进展, 2015, 43 (6): 30-35.
- [23] Meehan M, Cafferkey M, Corcoran S, et al. Real-time polymerase chain reaction and culture in the diagnosis of invasive group B streptococcal disease in infants: a retrospective study[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2015, 34(1): 2413-2420.
- [24] Lint PV, Witte ED, Henau HD, et al. Evaluation of a real-time multiplex PCR for the simultaneous detection of *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp, *Shigella* [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2015, 34(3): 535-542.
- [25] Padmavathy B, Kumar RV, Patel A, et al. Rapid and sensitive detection of major uropathogens in a single-pot multiplex PCR assay[J]. Curr Microbiol, 2012, 65(1): 44.
- [26] Nagdev KJ, Bhagchandani SP, Bhullar SS, et al. Rapid diagnosis and simultaneous identification of tuberculous and bacterial meningitis by a newly developed duplex polymerase chain reaction[J]. Indian J Microb, 2015, 55(2): 213-218.
- [27] Bhagchandani SP, Kubade S, Nikhare PP, et al. Nested PCR assay for eight pathogens: a rapid tool for diagnosis of bacterial meningitis[J]. Mol Diagn Ther, 2015, 20(1): 1-10.
- [28] Lima JF, Guedes GM, Lima JF, et al. Single-tube nested PCR assay with in-house DNA extraction for *Mycobacterium tuberculosis* detection in blood and urine[J]. Rev Soci Bras Med Trop, 2015, 48(6): 731-738.
- [29] Kweon OJ, Choi JH, Song UH, et al. Performance evaluation of a DNA chip assay in the identification of major genitourinary pathogens [J]. J Microb Meth, 2015, 109 (1): 117-122.
- [30] James BT, McLoughlin K, et al. Analysis of sensitivity and rapid hybridization of a multiplexed microbial detection microarray[J]. J Virolog Method, 2014, 201(1): 73-78.
- [31] 吴友根, 杨兴萍, 王军, 等. 结核蛋白芯片检测诊断结核病的价值[J]. 中国感染与化疗杂志, 2014, 14(3): 196-198.

(收稿日期: 2016-04-08 修回日期: 2016-05-08)

• 综 述 •

Notch 信号通路与慢性粒细胞白血病关系的研究进展

张丹阳 综述, 张永清[△]审校

(中国人民解放军第 309 医院血液科, 北京 100091)

关键词: Notch 信号通路; 慢性粒细胞白血病; 分子遗传学

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.19.054 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)19-2830-03

慢性粒细胞白血病(CML)是一种起源于骨髓多能造血干细胞的恶性克隆性肿瘤,其临床分期为慢性期、加速期、急变

期。CML 分子遗传学特征为 BCR/ABL 融合基因,该融合基因编码出具有酪氨酸激酶活性的癌蛋白,干扰细胞凋亡,导致

[△] 通讯作者, E-mail: zhangyongqing0725@163.com。

粒细胞增殖。酪氨酸激酶抑制剂的出现可使 CML 迅速得到缓解,但治疗过程中仍会出现耐药,疾病进展。Notch 信号通路调节造血干细胞的分化、增殖和凋亡^[1],造血祖细胞,淋系、髓系、红系前体细胞,外周血淋巴细胞、单核细胞及中性粒细胞中均有表达^[2]。Notch 通路的异常激活参与多种造血系统疾病的发生,包括急性 T 淋巴细胞白血病、多发性骨髓瘤、慢性淋巴细胞白血病等。Notch 信号通路同样与 CML 密切相关,Notch 通路调节 CML 细胞系 K562 细胞的分化^[3],其活化抑制 K562 细胞的增殖^[4-5]。然而,目前更多研究发现 Notch 信号通路与 BCR/ABL 融合基因有关,调节 CML 的白血病干细胞(LSC)的增殖,参与 CML 的进展。本文就近年来 CML 与 Notch 信号通路研究进展作一综述。

1 Notch 信号转导通路

Notch 信号通路是进化上十分保守的一条信号通路,由 Notch 受体(Notch1-4)、Notch 配体(Jagged1-2,Delta-like-1、3、4)和胞内效应分子 3 部分组成^[6]。Notch 受体是一种跨膜蛋白,包括胞外区、跨膜区及胞内区^[7]。细胞外结构域含有数量可变的表皮生长因子重复序(EGF-R)和 3 个 LNR(Lin/Notch repeats)区。而胞内区包含 RAM 区、6 个锚蛋白重复序列区和脯氨酸-谷氨酸-丝氨酸-苏氨酸富集区(PEST)。Notch 配体均为单体跨膜蛋白,哺乳动物主要为 Jagged1-2, DLL1、3、4^[8]。

正常的 Notch 信号通路是通过受体配体结合后相互作用而启动。第 1 次(S_1)裂解:Notch 受体被 furin 蛋白酶裂解后形成异二聚体转移到细胞膜上。第 2 次(S_2)裂解:在与相邻细胞上的 Notch 配体结合后,被金属蛋白酶酶切,胞外片段脱落,胞内部分粘连在细胞膜上。第 3 次(S_3)裂解:胞内部分再被多蛋白复合体组成的 γ -分泌酶酶切后释放出可溶性的 Notch 胞内段^[9]。胞内段(ICN)与 Mastermind 样蛋白一起形成复合物转录活化因子,最终激活下游靶基因,包括 Hes1、HERP、RhoU 基因等。这些基因活化转录,与细胞的增殖、分化和生存有关^[10]。此外 Notch 信号通路下游靶基因还包括细胞周期因子 D1、p21 和 NF- κ B 等。Notch 信号通路精确调控着细胞的分化、增殖和凋亡。

2 Notch 信号通路与 LSC

CML 起源于造血干/祖细胞(HSPC)的恶性转化。这种保留了造血干细胞(HSC)自我更新的能力,而失去了多向分化能力的 HSPC 被认为是 CML 的 LSC^[11]。LSC 的存在导致了 CML 的产生,而处于静止期 LSC 的大量扩增诱导了疾病的进展。在慢性期(CP)具有 HSC 表型的细胞($CD34^+ CD38^- lin^-$)为 LSC^[12],在 CML 的急变期(BC) $CD34^+ CD38^+$ 的粒单系祖细胞表达较高水平的 BCR/ABL 融合基因,并显示了 LSC 的功能^[13]。目前针对 LSC 的研究主要集中在 $CD34^+$ 的细胞群。

研究发现 Notch1、Notch2 及下游靶基因 Hes1 在大部分 CML CP 患者 $CD34^+ Thy^+$ 细胞和全部 $CD34^+$ 的细胞中表达上调。特别是 Notch 信号通路在 $CD34^+ Thy^+$ 细胞中异常活化,更加说明 CML LSC 内存在着 Notch 信号通路的异常活化^[14]。CML LSC 中存在信号通路交叉调节网络,包括 Shh、Wnt、Notch 和 Hox 信号通路。CML $CD34^+$ 细胞中 Notch 和 Hox 信号通路受抑制,Shh 和 Wnt 信号通路高度活化,导致 LSC 扩增,促使疾病进展^[15]。同时,骨髓微环境也同 Notch 信号通路一起参与调控正常干细胞和 LSC^[16],造血微环境骨髓基质细胞中存在 Notch 受体及其配体。骨髓内成骨细胞表达 Notch 配体 Jagged-1,与干细胞受体结合后激活 Notch 信号通

路抑制干细胞自我更新。然而,Jagged-1 配体的缺失导致静止期 LSC 大量增殖,加速 CML 进入 BC^[17]。因此 Notch 信号通路异常,可能促进 CML 干细胞的自我更新和增殖,在 CML 的发病和疾病进展中发挥重要作用。CML LSC 对 TKI 治疗不敏感^[18],在研究 CML CP 患者 $CD34^+$ 细胞中发现,Notch/Hes1 信号通路与 BCR-ABL 融合基因相拮抗^[19],LSC 耐药机制可能与 TKI 抑制 BCR-ABL 基因表达,导致 Notch 信号通路活化,进而促进干细胞更新相关。研究 Notch 信号通路调控 LSC 机制,为清除 LSC,阻止 CML 的进展提供了新的治疗思路。

3 Notch 信号通路与 CML 进展

CML 疾病的进展呈现明显的时相性:最初为病情相对缓和的 CP,经过 3~5 年进展为加速期(AP),此时骨髓和外周血的幼稚细胞增多,再经过 6~8 个月进展为 BC,在 BC 内骨髓和外周血的幼稚细胞急剧增多,病情凶险,半数以上患者在 3 个月内死亡。目前许多研究表明 Notch 信号通路与 CML 进展密切相关。

应用 p210BCR-ABL 基因反转录病毒表达载体转染小鼠,造成 CML 动物模型,引起 Notch1 胞内区过表达,Notch1 胞内区异常表达与 BCR/ABL 激酶活性增强协同促使 CML 转基因鼠急变^[20]。Hes1 为 Notch 信号通路下游重要靶基因,将同时表达 Hes1 和 BCR-ABL 的粒巨噬祖细胞(GMP)、髓系祖细胞(CMPs)移植受体小鼠,受体小鼠迅速形成类似 CML 的 BC 疾病^[21]。说明 Notch/Hes1 信号通路的活化导致 CML 进入 BC/AP。叶静静^[22]检测不同临床分期 CML 患者骨髓单个核细胞 Notch1 mRNA、Hes1 mRNA 表达情况,发现 CML 的 BC 及 CP 患者 Notch1 mRNA、Hes1 mRNA 表达明显高于健康对照者,且 BC 患者 Notch1 中位表达水平尤其高于 CP 患者。进一步证实活化的 Notch 信号通路参与 CML 疾病的进展。

然而,Notch 信号通路参与 CML 进展的机制尚未完全阐明,Yang 等^[23]研究显示 CML BC 患者 RBM15 蛋白表达明显高于 CP 或 AP 患者,其机制可能为 Notch 通路引起转录激活 RBM15 蛋白的表达,进而导致 CML 疾病进展。小鼠模型中,BCR-ABL、NUP98-HOXA9 融合基因导致下游转录因子 MSI2 表达上调,活化 Numb-Notch 信号通路,进而 Hes1 高表达导致 CML 进展^[24]。在小鼠骨髓移植的模型中,BCR/ABL 和 Hes1 基因高水平表达上调基质金属蛋白酶 9(MMP-9)促进 CML 进入 BC^[25]。因此,Notch 信号通路参与 CML 疾病进展,可能与其下游一系列靶基因活化有关。尤其是 Hes1 基因高表达与 CML 进展的关系密不可分。

4 小结与展望

现阶段 CML 发病率逐渐提高,TKI 如伊马替尼、达沙替尼等治疗虽然取得了良好的效果,然而在大多数情况下,一旦停止治疗或疾病加速^[26-27],残留的 LSC 会导致疾病进展,CML 进入 BC。Notch 信号通路表达异常参与 LSC 恶性扩增,加速疾病进展。目前大量新型的针对 Notch 信号分子的靶向治疗药物正在研究, γ -分泌酶抑制剂 GS II 是 Notch 分子的特异性抑制分子,可诱导慢性淋巴细胞白血病细胞生长停滞及凋亡^[28],Notch 信号通路在 CML 的表达特点及作用可为治疗 CML 提供新的方向。

综上所述,Notch 信号通路参与调控 CML LSC 的增殖,加速疾病的进展。但其作用机制尚未完全阐述清楚,可以从造血微环境角度对 Notch 信号通路进一步研究,明确 Notch 信号通路与疾病耐药的相互关联,必将为 CML 治疗策略的进展带来

新的曙光。

参考文献

- [1] Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development [J]. *Science*, 1999, 284(5415): 770-776.
- [2] Milner LA, Bigas A. Notch as a mediator of cell fate determination in hematopoiesis: evidence and speculation [J]. *Blood*, 1999, 93(8): 2431-2448.
- [3] Lloyd T, Lam CR, Jason N, et al. Suppression of erythroid but not megakaryocytic differentiation of K562 erythroleukemic cells by Notch1 [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(26): 19676-19684.
- [4] Yin DD, Fan FY, Hu XB, et al. Notch signaling inhibit the growth of the human chronic myeloid leukemia cell line K562 [J]. *Leukemia research*, 2009, 33(4): 109-114.
- [5] Yang Z, Yang C, Zhang S, et al. Notch2 inhibits proliferation of chronic myeloid leukemia cells [J]. *Oncology Letters*, 2013, 5(1): 1390-1394.
- [6] Radtke F, Fasnacht N, Macdonald HR. Notch signaling in the immune system [J]. *Immunity*, 2010, 32(1): 14-27.
- [7] Mumm JS, Kopan R. Notch signaling: from the outside in [J]. *Dev Biol*, 2000, 228(2): 151-165.
- [8] Demarest RM, Ratti F, Capohianco AJ. It's T-ALL about Notch [J]. *Oncogene*, 2008, 27(3): 5082-5091.
- [9] Radtke F, Wilson A, Mancini SJ, et al. Notch regulation of lymphocyte development and function [J]. *Nat Immunol*, 2004, 5(3): 247-253.
- [10] Bray SJ. Notch signaling: a simple pathway becomes complex [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(9): 678-689.
- [11] Testa U. Leukemia stem cells [J]. *Ann Hematol*, 2011, 90(3): 245-271.
- [12] Jorgensen HG, Holyoake TL. Characterization of cancer stem cells in chronic myeloid leukemia [J]. *Biochem Soc Trans*, 2007, 35(Pt 5): 1347-1351.
- [13] Jamieson CH, Ailles LE, Dylla SJ, et al. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML [J]. *N Engl J Med*, 2004, 351(7): 657-667.
- [14] Stier S, Cheng T, Dombkowski D, et al. Notch1 activation increases hematopoietic stem cell self-renewal in vivo and favors lymphoid over myeloid lineage outcome [J]. *Blood*, 2002, 99(1): 2369-2378.
- [15] Sengupta A, Banerjee D, Chandra S, et al. Deregulation and cross talk among Sonic hedgehog, Wnt, Hox and Notch signaling in chronic myeloid leukemia progression [J]. *Leukemia*, 2007, 21(5): 949-955.
- [16] Bin Z, Yin WH, Qin H, et al. Altered Microenvironmental regulation of leukemic and normal stem cells in chronic myelogenous leukemia [J]. *Cancer Cell*, 2012, 21(1): 577-592.
- [17] Marisa B, Bin Z, Yin WH, et al. Osteoblast ablation reduces normal long-term hematopoietic stem cell self-renewal but accelerates leukemia development [J]. *Blood*, 2015, 125(17): 2678-2688.
- [18] Corbin AS, Agarwal A, Loriaux M, et al. Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity [J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(1): 396-409.
- [19] Abdullah A, Anne-Marie B. Potential role of Notch signaling in CD34⁺ Chronic myeloid leukemia cells: cross-talk between Notch and BCR-ABL [J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0123016.
- [20] Mizuno T, Yamasaki N, Miyazaki K, et al. Over expression/enhanced kinase activity BCR/ABL and altered expression of Notch1 induced acute leukemia in P210 BCR-ABL transgenic mice [J]. *Oncogene*, 2008, 27(24): 3465-3674.
- [21] Fumio N, Mamiko SY, Yukiko K, et al. Hes1 immortalizes committed progenitors and plays a role in blast crisis transition in chronic myelogenous leukemia [J]. *Blood*, 2010, 115(14): 2872-2881.
- [22] 叶静静. Notch、VEGF、Ang 通路及 microRNA 对髓系白血病患者预后影响与耐药机制的研究 [D]. 济南: 山东大学, 2013.
- [23] Yang Y, Wang S, Zhang Y, et al. Biological effects of decreasing RBM15 on chronic myelogenous leukemia cells [J]. *Leuk Lymphoma*, 2012, 53(11): 2237-2244.
- [24] Jaspal K, Frauke R, Christian O, et al. Upregulated MSI2 is associated with more aggressive leukemia [J]. *Leuk Lymphoma*, 2014, 56(7): 1-28.
- [25] Nakahara F, Kitauro J, Uchida T, et al. Hes1 promotes blast crisis in chronic myelogenous leukemia through MMP-9 upregulation in leukemic cells [J]. *Blood*, 2014, 123(25): 3932-3942.
- [26] Cortes J, Hochhaus A, Hughes T, et al. Front-line and salvage therapies with tyrosine kinase inhibitors and other treatment in chronic myeloid leukemia [J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(5): 524-531.
- [27] Mahon FX, Rea D, Gail HJ, et al. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: The prospective multicentre Stop Imatinib (STIM) trial [J]. *Lancet Oncol*, 2010, 11(11): 1029-1035.
- [28] Hubmann R, Hilgand M, Schnabl S, et al. Gliotoxin is a potent Notch2 transactivation inhibitor and efficiently induces apoptosis in chronic lymphocytic leukaemia (CLL) cells [J]. *Br J Haematol*, 2013, 160(5): 618-629.

(收稿日期: 2016-03-06 修回日期: 2016-05-06)